ACCESSION NUMBER

306359

PRESS MARK

~~DC. G. C~~ (2)

22200067064

Med
K3446

VORTRÄGE UND AUFSÄTZE

ÜBER

ENTWICKELUNGSMECHANIK DER ORGANISMEN

UNTER MITWIRKUNG VON

Prof. E. ALBRECHT, Frankfurt a/M., Prof. D. BARFURTH, Rostock, Prof. E. BATAILLON, Dijon, Prof. BENEKE, Marburg, Prof. TH. BOVERI, Würzburg, Prof. H. BRAUS, Heidelberg, Prof. C. M. CHILD, Chicago, Prof. YV. DELAGE, Paris, Prof. A. FISCHEL, Prag, Doc. Dr. R. FUCHS, Erlangen, Prof. W. GEBHARDT, Halle, Prof. E. GOLDLEWSKI Jun., Krakau, Prof. GR. HARRISON, New Haven, Prof. C. HERBST, Heidelberg, Doc. Dr. AM. HERLITZKA, Turin, Doc. Dr. E. KÜSTER, Halle, Prof. J. LOEB, Berkeley, Prof. O. MAAS, München, Prof. T. H. MORGAN, New York, Dir. Doc. Dr. H. PRZIBRAM, Wien, Prof. RHUMBLER, Münden Prof. E. SCHWALBE, Karlsruhe i. B., Prof. SPEMANN, Würzburg, Prof. STRASSER, Bern, Prof. TORNIER, Berlin, Prof. EDM. WILSON, New York, u. A.

HERAUSGEGEBEN VON

Prof. WILHELM ROUX.

HEFT II.

ÜBER DEN CHEMISCHEN CHARAKTER DES BEFRUCHTUNGSVORGANGS UND SEINE BEDEUTUNG FÜR DIE THEORIE DER LEBENSERSCHEINUNGEN

VON

Prof. Dr. JACQUES LOEB.

LEIPZIG

VERLAG VON WILHELM ENGELMANN

1908.

HEFT II.

ÜBER DEN CHEMISCHEN CHARAKTER

DES

BEFRUCHTUNGSVORGANGS

UND SEINE BEDEUTUNG FÜR DIE THEORIE DER LEBENSERSCHEINUNGEN.

VORTRAG

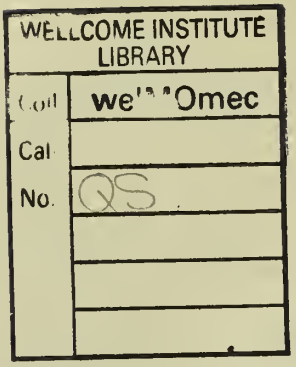
GEHALTEN AUF DEM INTERNATIONALEN ZOOLOGENKONGRESS
ZU BOSTON AM 22. AUGUST 1907

VON

JACQUES LOEB.

LEIPZIG
VERLAG VON WILHELM ENGELMANN
1908.

JOSEF WELKHAMMER
Buch-, Kunst- u. Musikantiquariat
Antiquariat u. Leihbücherei
Wien, VII., Burggasse 123



Alle Rechte, besonders das der Übersetzung, werden vorbehalten.

Druck der Kgl. Universitätsdruckerei von H. Stürtz in Würzburg.

I.

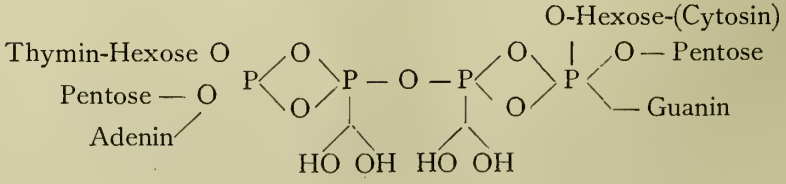
Man kann vielleicht verschiedener Meinung darüber sein, ob es je gelingen wird, Lebewesen künstlich herzustellen; allein darüber wird wohl nur eine Stimme herrschen, daß wir nicht hoffen können, lebende Substanz künstlich herzustellen, ehe wir wissen, was dieselbe eigentlich ist. Das charakteristischste Merkmal der Lebewesen ist die Eigentümlichkeit derselben, sich automatisch fortzupflanzen. Wir mögen imstande sein, alle anderen Eigentümlichkeiten der lebenden Substanz im einzelnen nachzuahmen — wir können aber einstweilen keine Gebilde herstellen, die sich automatisch fortpflanzen. Die Antwort auf die Frage, was lebende Substanz ist, würde deshalb in erster Linie eine Antwort auf die Frage sein müssen: Was bestimmt die Vorgänge der automatischen Entwickelung und Fortpflanzung? Da alle Lebenserscheinungen in letzter Substanz rein chemische Vorgänge sind, so muß die Antwort auf jene Frage auch darauf hinauslaufen, die chemischen Vorgänge herauszufinden, welche der Fortpflanzung und Entwickelung zugrunde liegen. Ich habe seit langer Zeit den Eindruck gewonnen, daß der Angriffspunkt für die Beantwortung dieser Frage in der Analyse desjenigen Eingriffs liegt, durch welchen das schlummernde Ei veranlaßt wird, sich zu einem Embryo zu entwickeln — nämlich des Befruchtungsvorgangs.

II.

Das Spermatozoon übt zwei Arten von Wirkungen auf das Ei aus; erstens regt es die Entwickelung an und zweitens überträgt

es die väterlichen Erbstoffe. Wir wollen uns hier nur mit der entwickelungserregenden Wirkung befassen. Fragen wir nun, was die auffallendste chemische Wirkung des Spermatozoons auf das Ei ist, so müssen wir gestehen, daß es eine rasche Synthese von Nukleinstoffen aus Cytoplasmastoffen ist [1]). Betrachten wir ein Ei unmittelbar nach der Befruchtung. Es hat einen Kern, der sich zu gleichen Teilen aus dem Kopf des Spermatozoons und dem Eikern zusammensetzt; der Rest des Eis soll als Cytoplasma bezeichnet werden. Dann beginnt die Furchung des Eis. Der ursprüngliche Kern teilt sich nacheinander in zwei, vier, acht und sofort Kerne und auf jede Kernteilung folgt eine Zellteilung. Bei jeder Kernteilung besitzt zunächst jeder Tochterkern nur die halbe Masse des Mutterkerns; Boveri hat aber gezeigt, daß die Tochterkerne rasch an Masse zunehmen und genau die Größe des Mutterkerns erreichen. Es wächst also jeder Tochterkern in der Ruhepause zwischen zwei Teilungen auf das Doppelte seiner ursprüngliche Masse.

Diese Synthese von Kernstoffen beansprucht unser Interesse. Die wesentliche Masse des Kerns besteht aus einem nukleinsauren Salz, dessen basischer Bestandteil ein Eiweißkörper ist, Protamin, dessen künstliche Synthese aus seinen Verdauungsprodukten neuerdings meinem Kollegen A. E. Taylor gelungen ist, oder Histon. Das Skelett der Nukleinsäure scheint nach Burian eine kondensierte Phosphorsäure zu sein, an die sich mindestens zwei weitere chemische Gruppen angliedern, nämlich Purinbasen (Adenin und Guanin und möglicherweise andere Repräsentanten derselben Gruppe) und Kohlehydrate, eine Pentose und eine Hexose. Zur Veranschaulichung der Konstitution der Nukleinsäure möge das folgende Schema von Burian [2]) dienen, von dem er aber selbst sagt, daß es nicht völlig zutreffend sein kann, da es 41 (statt 40) Kohlenstoffatome im Molekül hat.



Bei der Frage nach der Synthese der Nukleinsäure infolge der Befruchtung würden wir zunächst auf die Herkunft der Phosphorsäure achten müssen. Bei den Eiern von Tieren, die sich im Seewasser entwickeln, könnte man an die Möglichkeit denken, daß diese Phosphate dem Seewasser entnommen werden. Ich habe mich aber durch Versuche mit den Lösungen von chemisch reinen Salzen, die keine Phosphate enthielten, überzeugt, daß die befruchteten wie die parthenogenetisch sich entwickelnden Eier des Seeigels ihre Kernsynthese in phosphatfreien Lösungen ebenso rasch vollziehen wie in phosphathaltigen Lösungen; es folgt daraus, daß die Phosphate für die Kernsynthese während der ersten Entwickelungsstadien dem Eiinhalt selbst entstammen. Das gleiche gilt auch für die anderen Bestandteile des Kerns, da ja die Furchung der Seeigeleier in einer Mischung von Na Cl, KCl und $Ca\,Cl_2$, wenn sie nur die geeignete Konzentration der Hydroxylionen besitzt, bis zum Blastula- oder Gastrulastadium erfolgen kann. Miescher fand nun, daß beim Lachs während der Periode der Bildung der Geschlechtszellen der Lezithingehalt des Blutes vermehrt ist, und er schloß, daß das Lezithin einer der Stoffe ist, aus dem sich die Nukleinsäure bildet. Das Ei selbst scheint keine Nukleinsäure vorgebildet zu enthalten, wie die Bestimmungen von Kossel am Hühnerei und von Tichomiroff am Insektenei gezeigt haben[3]). Dagegen aber besitzen alle Eier und vielleicht alle embryonalen Zellen relativ große Mengen von Lezithin, worauf schon Hoppe-Seyler aufmerksam gemacht hat. Das Lezithin ist distearin- (oder olein-), glyzerinphosphorsaures Cholin, und die Konstitution des Lezithins wird durch die folgende Formel veranschaulicht:

$$C_3H_5\begin{matrix}(C_nH_{2n-1}O_2)_2\\ \diagup\quad\diagdown\\ O\,.\,PO\,OH\,.\,O\end{matrix}C_2H_4N(CH_3)_3OH.$$

Es besteht also aus zwei Hauptgruppen, Glyzerin-Phosphorsäure — Fettsäure und Cholin. Der letztere Bestandteil scheint für die Nukleinsynthese nicht verwertbar zu sein. Der andere Bestandteil ist aber geeignet, das Phosphorsäureskelett des Nukleinmoleküls zu bilden. Auch das Glyzerin und vielleicht auch die Ölsäure könnten

für den Aufbau der Kohlehydratgruppen des Nukleinsäuremoleküls Verwendung finden. Freilich könnte die Fettsäure nur durch Oxydationen in Kohlehydrat verwandelt werden. Wir werden aber in der Tat sehen, daß Oxydationsprozesse die Voraussetzung der Nukleinsynthese bilden. Einstweilen aber soll uns die Veranschaulichung der Konstitution des Lezithins nur dazu dienen, um zu zeigen, daß dasselbe erst eine Spaltung erfahren muss — wobei es die Cholingruppe verliert — ehe es für den Aufbau der Nukleinsäure brauchbar wird. Die Frage der Nukleinsynthese ist, wie wir sehen, chemisch noch nicht aufgeklärt, sie wird das erst, wenn es gelingt diese Synthese künstlich auszuführen. In der Chemie wie in der Biologie ist die Beherrschung der Naturerscheinungen und deren völlige Nachahmung der einzig sichere Weg zur Erkenntnis derselben.

Wir gewinnen nun aber aus biologischen Versuchen einige weitere Aufschlüsse. Das mit dem Spermatozoon befruchtete Ei kann sich nur dann entwickeln, wenn freier Sauerstoff zugegen ist[4]). Vor 12 Jahren zeigte ich, daß, wenn man dem befruchteten Ei den Sauerstoff vollständig entzieht, keine Kernteilung und keine Zellteilung möglich ist; ja noch mehr, es tritt keine Zunahme der Kernmasse ein und es unterbleiben also die Vorgänge der Nukleinsynthese vollständig. Ich habe ferner gezeigt, daß derselbe Effekt erreicht wird, wenn wir die Oxydationsvorgänge im Ei durch Cyankalium unmöglich machen. Cyankalium oder vielleicht die hydrolytisch daraus abgespaltene Blausäure verhindern die Oxydationsvorgänge im Ei. Schon der Zusatz von $^1/_2$ ccm einer $^1/_{20}$ %igen Cyankaliumlösung zu 50 ccm Seewasser reicht aus, um die Wirkung des Spermatozoons im befruchteten Seeigelei sofort zum Stillstand zu bringen, ohne daß das Ei für eine Zeitlang wenigstens geschädigt würde[5]). Läßt man den Sauerstoff wieder zu den Eiern zutreten, die im Sauerstoffvakuum waren, so beginnt die Nukleinsynthese und die Furchung; das gleiche tritt ein, wenn man die Eier aus dem cyankaliumhaltigen Seewasser in normales Seewasser zurückbringt und für gute Durchlüftung derselben sorgt. Oxydationsvorgänge sind also die unerläßliche Voraussetzung der Nukleinsynthese;

wie schon angedeutet, könnte es sich um Bildung der Kohlehydrate aus Fettsäuren handeln, aber das ist nicht die einzige Möglichkeit.

Zweitens können wir nachweisen, daß außer den Oxydationsvorgängen noch andere Prozesse durch die Befruchtung im Ei angeregt resp. beschleunigt werden, und daß die letzteren auch in der Abwesenheit des Sauerstoffes vor sich gehen[6]). Das folgt aus der verschiedenen Toleranz befruchteter und unbefruchteter Eier gegen Sanerstoffmangel. Bringt man befruchtete Eier in ein Sauerstoffvakuum oder hindert man deren Oxydationen durch den Zusatz von Cyankalium, so entwickeln sie sich, wie gesagt, nicht; sie entwickeln sich aber, wenn man sie hinterher in lufthaltiges, normales Seewasser zurückbringt (das von Cyankalium frei ist). Die Entwickelungsfähigkeit dieser Eier nimmt aber um so mehr ab, je länger die Oxydationsvorgänge in denselben unterdrückt waren. Seeigeleier, welche nach der Befruchtung in sauerstofffreies Seewasser gebracht wurden und hier 24 Stunden blieben (bei 15° C) furchten sich zwar noch, wenn sie in normales, sauerstoffhaltiges Seewasser zurückgebracht wurden, sie waren aber nicht mehr imstande, sich über das Blastulastadium hinaus zu entwickeln. Brachte man aber die Eier desselben Weibchens gleichzeitig und bei derselben Temperatur unbefruchtet 24 Stunden lang in sauerstofffreies Seewasser und setzte man nach ihrer Übertragung in normales Seewasser Samen zu, so entwickelten sich diese Eier zu vollkommen normalen Pluteen. Ebenso deutlich kommt dieser Unterschied im Verhalten befruchteter und unbefruchteter Eier zum Ausdruck, wenn wir die Oxydation im Ei mit Cyankalium unterdrücken. Daraus folgt, daß bei Sauerstoffmangel das befruchtete Ei erheblich rascher leidet als das unbefruchtete Ei. Das ist verständlich unter der Annahme, daß das Spermatozoon noch andere chemische Reaktionen im Ei anregt oder beschleunigt als die Oxydationsvorgänge, nämlich Hydrolysen; und daß die Produkte dieser Hydrolysen durch die Oxydation zu den geeigneten Stoffen, insbesondere den Nukleinverbindungen, verarbeitet werden. Unterbleiben die Oxydationen, so kommt es zur Anhäufung dieser Spaltungsprodukte, die dann vermutlich zu fehlerhaften, das Ei schädigenden Reaktionen Ver-

anlassung geben. Wir verstehen so, daß das befruchtete Ei bei Sauerstoffmangel viel rascher leidet, als das unbefruchtete Seeigelei; das letztere scheint imstande zu sein, den Sauerstoffmangel mehrere Tage oder noch länger ohne Schaden zu ertragen. Es ist möglich, daß eine dieser Hydrolysen, die durch die Befruchtung in den Gang gesetzt werden, die Spaltung des Lezithins ist.

III.

Nach unserer jetzigen Kenntnis der chemischen Struktur des Spermatozoons vermögen wir nicht zu verstehen, warum sein Eintritt ins Ei entwickelungserregend wirken sollte. Der der Masse nach bei weitem überwiegende Teil des Spermatozoons ist sein Kopf, der im wesentlichen nach Burian dieselbe Zusammensetzung hat, wie jeder andere Zellkern und der Eikern, d. h. der Hauptsache nach aus einem nukleinsauren Histon oder Protamin oder einem nahe verwandten Eiweißkörper besteht. Der Schwanz des Spermatozoons ist „Cytoplasma", anscheinend durch nichts besonders chemisch charakterisiert, als vielleicht durch seinen relativ reichen Gehalt an Lezithin und Fett. Diese Daten liefern keinen Anhaltspunkt zu Vermutungen über die Ursache der entwickelungserregenden Kraft des Spermatozoons.

Wir müssen uns deshalb einstweilen, wenn wir weitere Einsichten über das Wesen des Befruchtungsvorganges gewinnen wollen, an die Versuche über künstliche Parthenogenese wenden. Die Tatsachen der heterogenen Hybridisation weisen darauf hin, daß die entwickelungserregenden Stoffe im Spermatozoon bei den verschiedenen Formen ziemlich nahe verwandt, wenn nicht identisch sind. Zu diesem Schlusse werden wir gezwungen, wenn wir sehen, daß die Eier des Seeigels nicht nur durch die Spermatozoen anderer Seeigelformen, sondern auch durch die verschiedener Seesterne (Asterias, Asterina, Pycnopodia), der Schlangensterne, der Crinoiden (Godlewski), und nach Kupelwieser sogar der Mollusken (Mytilus) befruchtet werden können [7]). Was der heterogenen Hybri-

disation Grenzen setzt, ist anscheinend nur der Umstand, daß das heterogene Spermatozoon nur schwer oder gar nicht in das artfremde Ei einzudringen vermag. Deshalb ist es oft für das Gelingen der heterogenen Hybridisation erforderlich, die Konstitution des Seewassers abzuändern, etwa seine Alkalinität zu erhöhen. Durch das gleiche Mittel kann man es auch zustande bringen, daß Seeigeleier, die durch Samen der eigenen Art nicht befruchtet werden können, — was gelegentlich vorkommt, namentlich am Ende der Laichzeit — durch längeres Liegen in Seewasser, dem man etwas Natronlauge zugesetzt hat, befruchtungsfähig werden. Es folgt daraus, daß wir nur von solchen Methoden der künstlichen Parthenogenese Aufschlüsse über das Wesen der Befruchtung erwarten dürfen, welche nicht auf eine einzige Tierspezies beschränkt sind.

Wir wollen mit der Betrachtung der Methoden der künstlichen Parthenogenese beim Seeigelei beginnen, da dieselben hier am besten erforscht sind. Es gelang bei diesen Tieren zuerst mit Hilfe der Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers Larven aus unbefruchteten Eiern hervorzubringen, und zwar in Woods Hole an den Eiern von Arbacia. Die Methode bestand einfach darin, daß die unbefruchteten Eier von Arbacia auf etwa 2 Stunden (bei 16° bis 20°) in hypertonisches Seewasser, etwa 100 ccm Seewasser + 15 ccm 2½ N NaCl gebracht und dann in normales Seewasser übertragen wurden[8]). Diese Methode aber, welche in Woods Hole konstante und relativ gute Resultate ergab, gab sehr unkonstante und wechselnde Ergebnisse an einer Seeigelform des Stillen Ozeans, nämlich Strongylocentrotus purpuratus in Pacific Grove. Auch in Neapel und in den französischen Laboratorien waren nach den Berichten von Herbst, Giard u. a. die Erfolge anfangs nicht sehr gut; während in Beaufort, North Carolina, E. B. Wilson mit der von mir angewendeten Methode gute Resultate erhielt.

Es war mir nun bereits bei den ersten Versuchen aufgefallen, daß die unbefruchteten Eier, welche durch die Behandlung mit hypertonischem Seewasser zur Entwickelung veranlaßt waren, in der Form ihrer Entwickelung sich typisch von den durch Samen befruchteten Eiern unterschieden. Dieser Umstand war mir am An-

fang willkommen, da Jeder den Einwand erhob, daß es sich bei meinen Versuchen um eine Infektion des Seewassers durch Samen gehandelt habe; er bildete deshalb ein sicheres und willkommenes Kriterium, die parthenogenetische Entwickelung von der durch Samen angeregten zu unterscheiden. Die wesentlichen Unterschiede waren folgende: Das durch Samen befruchtete Seeigelei bildet unmittelbar nach dem Eintritt des Spermatozoons eine Befruchtungsmembran, während bei dem osmotisch zur Entwickelung veranlaßten Ei keine deutlich wahrnehmbare Membran bei Arbacia gebildet wird. Ferner verläuft die Furchung beim befruchteten Ei rascher und regelmässiger als beim osmotisch zur Entwickelung veranlaßten Seeigelei. Diese Unterschiede in der Wirkung des Samens und der Behandlung des Eies mit hypertonischem Seewasser führten zur Vermutung, dass die letztere Behandlung einen Teil, aber nicht alle Bedingungen der Entwickelungserregung durch das Spermatozoon nachahme. Ich vermutete, daß in Wirklichkeit vielleicht die Kombination von zwei verschiedenen Agentien erlauben müsse, den Vorgang der Samenbefruchtung besser oder völlig nachzuahmen. Versuche, welche von diesem Gesichtspunkt aus unternommen wurden, ergaben, dass wenn man die unbefruchteten Eier des kalifornischen Seeigels Strongylocentrotus purpuratus erst einige Minuten mit Seewasser behandelt, dem man eine kleine, aber bestimmte Menge einer einbasischen Fettsäure oder irgend einer anderen Säure mit nur einer Karboxylgruppe zusetzt, die Eier eine typische Befruchtungsmembran bilden, sobald sie in normales Seewasser zurückgebracht werden. Behandelt man diese Eier hinterher 30 – 50 Minuten bei 15° C mit hypertonischem Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm 2½ n NaCl), so entwickeln sich bei richtiger Expositionsdauer so gut wie alle Eier zu Larven[9]). Bei einem Teil dieser Eier verläuft die Furchung völlig normal und diese Eier entwickeln sich zu völlig normalen Pluteen. Behandelt man die Eier nur mit einem der beiden Agentien, nämlich der Fettsäure oder der hypertonischen Lösung, so entwickelt sich kein Ei. Die Auslösung der Membranbildung allein führt bei Zimmertemperatur rasch zum Verfall des Eies[10]) und die 30—50 Minuten lange Behandlung unbe-

fruchteter Eier von Strongylocentrotus mit hypertonischem Seewasser bringt bei Zimmertemperatur überhaupt keine Wirkung hervor, so lange die Eier keine Membran besitzen. Man kann auch den Versuch in umgekehrter Ordnung anstellen, nämlich die Eier erst mit hypertonischem Seewasser und dann mit der Fettsäure behandeln. Bei dieser Reihenfolge muss man die Eier aber viel länger der hypertonischen Lösung, nämlich $1^1/_2 - 2$ Stunden lang aussetzen. Dieser Unterschied in der Expositionsdauer liegt wohl daran, daß wie wir sehen werden, die Hervorrufung der Membranbildung zu einer Beschleunigung gewisser chemischer Reaktionen im Ei führt, wodurch die chemische Wirkung des hypertonischen Seewassers rascher zustande kommt, als wenn das hypertonische Seewasser auf das intakte unbefruchtete Ei wirken muss.

Die Überlegenheit dieser neuen Methode über die alte, rein osmotische Methode ist bei den Eiern von Strongylocentrotus purpuratus besonders auffallend. Oft genug führte die Behandlung der unbefruchteten Eier mit hypertonischem Seewasser allein zu keiner Entwickelung oder zur Entwickeluug von nur wenig Eiern, während praktisch alle Eier desselben Weibchens zur Entwickelung gebracht wurden, wenn die Fettsäurebehandlung mit der Behandlung mit hypertonischem Seewasser kombiniert wurde; vorausgesetzt, daß die Expositionsdauer richtig gewählt wurde[11]).

Es läßt sich nun leicht zeigen, daß es sich hier nicht um eine direkte Wirkung der Fettsäure handelt, sondern daß die durch die Fettsäure bewirkte Membranbildung der entwickelungserregende Faktor ist. Um die Membranbildung durch Fettsäure hervorzurufen, ist es nötig, die unbefruchteten Eier bei 15^0 C etwa $1^1/_2 - 2^1/_2$ Minuten in eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 2,8 ccm n/10 Buttersäure (oder einer anderen einbasischen Fettsäure) zu bringen. Nimmt man nun die Eier etwas zu früh aus dieser Lösung, etwa nach 80 Sekunden, so bildet nur ein Teil der Eier nach der Übertragung in normales Seewasser Membranen. Bringt man dann diese Eier hinterher 30 – 50 Minuten lang in hypertonisches Seewasser, so furchen und entwickeln sich nur solche Eier zu Larven, welche eine Membran gebildet hatten.

Ein weiterer Beweis liegt in folgender Tatsache. Bereits 1887 veröffentlichten O. u. R. Hertwig die Tatsache, daß, wenn man Chloroform in Seewasser löst, die Seeigeleier in solchem Seewasser eine Befruchtungsmembran bilden und Herbst zeigte 1893, daß Benzol, Toluol und Xylol ebenso wirken. Ich vermutete, dass alle fettlösenden Stoffe eine solche Wirkung haben, und ein Versuch mit Amylen bestätigte diese Vermutung. Ruft man nun die Membranbildung der Eier mit einem solchen fettlösenden Stoffe hervor, so entwickeln sich die Eier ebenfalls zu Larven, wenn man sie hinterher 30—50 Minuten mit hypertonischem Seewasser behandelt. Man muss aber hierbei sehr rasch arbeiten, da diese fettlösenden Stoffe, wie Chloroform, Benzol, Amylen, rasch die Cytolyse der Eier herbeiführen. Aus diesem Grunde ist für die künstliche Parthenogenese die Hervorrufung der Membranbildung durch eine Fettsäure vorzuziehen.

Wir besitzen also jetzt in dieser neuen Methode der künstlichen Parthenogenese einen Weg, auf dem es gelingt, die Wirkung der Samenbefruchtung in allen Einzelheiten nachzuahmen. Ehe wir aber die Frage aufwerfen, welche Schlüsse wir hieraus auf das Wesen des Befruchtungsvorganges ziehen können, müssen wir erst eine andere Lücke ausfüllen. Die ursprüngliche, rein osmotische Methode der Entwickelungserregung hatte ziemlich zuverlässige Resultate an Arbacia in Woods Hole, sehr unzuverlässige Resultate an Strongylocentrotus purpuratus in Pacific Grove ergeben. Manchmal entwickelten sich viele, manchmal keine oder nur sehr wenige Eier bei der Anwendung dieser Methode. Wenn bei einer Methode solche quantitativ variierende Resultate zum Vorschein kommen, so kann man sicher sein, dass bei dieser Methode noch eine oder mehrere nicht erkannte Variabeln im Spiele sind. Nun war mir bei anderen Versuchen schon aufgefallen, daß das Seewasser in Woods Hole alkalischer ist als das Seewasser in Pacific Grove und ich prüfte, ob dieser Umstand etwas mit dem Unterschied der Resultate in Pacific Grove und Woods Hole zu tun habe. Diese Vermutung erwies sich als richtig [12]).

Es zeigte sich, daß völlig neutrale hypertonische Lösungen

mit einer Konzentration der Hydroxylionen $C_{HO} < 10^{-6}$ auch bei der stärksten Erhöhung des osmotischen Druckes die unbefruchteten Seeigeleier meist nicht zur Entwickelung veranlassen können; daß aber bei genügender Höhe der Konzentration der Hydroxylionen (Zusatz von etwa 1,5 ccm n/10 NaHO zu 50 ccm des hypertonischen Seewassers) schon eine geringe Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers ausreichte, um die unbefruchteten Eier von Strongylocentrotus purpuratus zur Entwickelung zu Larven zu veranlassen. Es stellte sich ferner heraus, daß die minimale Konzentration von Hydroxylionen, welche die hypertonische Lösung haben musste, um Entwickelung hervorzurufen, für die Eier verschiedener Weibchen verschieden hoch war. Für die Entwickelungserregung der Eier mancher Weibchen von Strongylocentrotus purpuratus reicht diejenige Konzentration der Hydroxylionen aus, welche das Seewasser in Pacific Grove hat, nämlich zwischen 10^{-6} und 10^{-5} normal. Für die Eier der meisten Weibchen ist diese Konzentration der Hydroxylionen zu niedrig. Man kann allgemein mit der rein osmotischen Methode der künstlichen Parthenogenese auch bei Strongylocentrotus gute Resultate erzielen, wenn man nur dafür sorgt, daß die Konzentration der Hydroxylionen genügend hoch ist.

Es ließ sich dann weiter zeigen, daß die beiden Agentien, nämlich die Hydroxylionen und der erhöhte osmotische Druck auch getrennt zur Wirkung kommen können; und zwar ergab sich bei diesen Versuchen ein völliger Parallelismus mit den Versuchen mit Fettsäure, da das Alkali wie die Fettsäuren wirkte. Bringt man die unbefruchteten Eier erst 2—3 Stunden in eine Mischung von 50 ccm neutraler $\frac{m}{2}$ van't Hoffscher Lösung + 0,5—1,0 ccm n/10 NaHO und setzt man sie dann 30—50 Minuten dem hypertonischen Seewasser aus (50 ccm Seewasser + 8 ccm 2½ n NaCl), so entwickeln sich solche Eier zu Larven. Behandelt man die Eier mit der hyperalkalischen Lösung allein, ohne sie hinterher dem hypertonischen Seewasser auszusetzen, so entwickeln sie sich nicht. Es wirkt also eine zwei- bis dreistündige Behandlung der Eier mit hyperalkalischer Lösung wie eine etwa zwei Minuten lange Behand-

lung mit der Fettsäure. Die volle Analogie zeigt sich auch darin, daß bei dieser Methode der Kombination der Alkaliwirkung und der Wirkung des hypertonischen Seewassers die Eier, welche sich entwickeln, alle oder fast alle Membranen bilden; nur ist diese Membran meist nicht so deutlich, wie bei der Fettsäuremembran, da sie gewöhnlich dem Cytoplasma dicht anliegt. Diese Membranbildung findet meist erst statt, oder wird meist erst sichtbar, nachdem die Eier aus dem hypertonischen in das normale Seewasser zurückgebracht sind.

Kehrt man die Reihenfolge der Eingriffe um und bringt man die Eier erst in die hypertonische und hinterher in die hyperalkalische Lösung, so muss man dieselben viel länger, nämlich $1^1/_2$—2 Stunden, in der hypertonischen Lösung lassen; was ja auch der Erfahrung bei der Behandlung der Eier mit den Fettsäuren entspricht [13]).

Damit sind wir in den Besitz einer sehr durchsichtigen Methode gelangt, durch welche wir die entwickelungserregende Wirkung des Spermatozoons auf das Ei nachzuahmen imstande sind; nämlich wir behandeln das unbefruchtete Ei von Strongylocentrotus purpuratus erst 1—2 Minuten mit einer sauren Lösung (etwa 50 ccm $\frac{m}{2}$ neutraler van't Hoffscher Lösung + 0,7 ccm n/10 Buttersäure) oder 2—3 Stunden mit einer hyperalkalischen Lösung (50 ccm $\frac{m}{2}$ van't Hoffscher Lösung + 0,7 ccm n/10 NaHO) und hinterher etwa 30—50 Minuten mit hypertonischem Seewasser. Die Behandlung mit Fettsäure und Alkali kann durch eine Behandlung der Eier mit einem fettlösenden Stoff ersetzt werden; Säuren mit einer Karboxylgruppe, Alkalien und fettlösende Stoffe wirken alle im Sinne einer Auslösung des Membranbildungsprozesses.

IV.

Ich habe noch nicht die Zeit gehabt, diese Resultate auf die Eier vieler anderer Tierformen anzuwenden, aber es macht mir den

Eindruck, als ob nunmehr die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese gewonnen und erkannt seien. Es handelt sich überall darum, daß entweder Behandlung der Eier mit Alkalien oder mit Säuren mit oder ohne nachfolgender Behandlung derselben mit hypertonischem Seewasser die Entwickelung unbefruchteter Eier veranlaßt.

Die unbefruchteten Eier von Polynoë, einer mariinen Annelide, können sich zu Larven entwickeln, wenn man sie dauernd in hyperalkalisches Seewasser*) bringt, am besten in einem lose mit einer Glasplatte bedeckten Uhrschälchen, wo die Sauerstoffversorgung eine günstige ist. Die Eier sind unreif, wenn sie dem Ovarium entnommen werden, und werden in gewöhnlichem Seewasser meist nur dann reif, wenn sie durch ein Spermatozoon befruchtet werden. Sie reifen aber, wenn sie einige Stunden im hyperalkalischen Seewasser liegen. Dabei bilden sie eine Membran und werfen die Polkörperchen aus. Wartet man, bis dieses stattgefunden hat, behandelt man sie dann 2 bis 3 Stunden (bei 15° C) mit hypertonischem Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) und bringt man sie dann in normales Seewasser zurück, so entwickeln sie sich rascher und viel mehr Eier furchen sich, als wenn sie bloß mit Alkali zur Entwickelung angeregt werden.

Ich hatte schon vor drei Jahren gefunden, daß eine kleine Zahl von den Eiern einer Molluska, Lottia gigantea, zur Entwickelung erregt werden kann, wenn man dieselben zwei Stunden lang in hypertonisches Seewasser bringt. Ich habe mich dieses Jahr davon überzeugen können, daß Behandlung der unbefruchteten Eier von Lottia mit neutralen hypertonischen Lösungen dieselben nicht zur Entwickelung anregt, daß, wenn man aber die Alkalinität des hypertonischen Seewassers durch Zusatz von Natronlauge passend erhöht, praktisch alle Eier zur Entwickelung gebracht werden können. Auch hier unterliegt die zur osmotischen Entwickelungserregung nötige Konzentration der Hydroxylionen für die Eier verschiedener Weibchen sehr grossen Schwankungen.

*) 50 ccm Seewasser + 1,5 ccm N/10 NaHO.

Auch bei den Eiern von Sipunculus gelang es durch passende Erhöhung der Konzentration der Hydroxylionen die Entwickelung derselben in Larven zu veranlassen[14]).

Was die Entwickelungserregung unbefruchteter Eier durch Säuren anbetrifft, so seien vor allem die Eier der Seesterne erwähnt, die durch kurze Behandlung mit allen beliebigen Säuren zur Entwickelung veranlasst werden können. Sie unterscheiden sich dadurch von den Eiern der Seeigel, bei denen nur eine bestimmte Gruppe von Säuren in diesem Sinne wirksam ist, nämlich solche mit einer einzigen Karboxylgruppe. Vielleicht wirkt auch die Gruppe von Säuren bei den Seesterneiern etwas besser als die anderen Säuren[15]).

Für die Seesterneier ist die Behandlung derselben mit der Säure für die Entwickelungserregung ausreichend und eine weitere Behandlung mit hypertonischem Seewasser ist überflüssig.

Bei einer Form der Seesterne, der Asterina von Pacific Grove, bewirkt der Eintritt des Spermatozoons im Ei die Bildung einer ebenso deutlichen Befruchtungsmembran wie beim Seeigelei. Diese Befruchtungsmembran lässt sich nun prompt bei diesem Ei durch dieselben Mittel hervorbringen, mit denen sie auch beim Seeigelei hervorgebracht wird, nämlich durch Behandlung der Eier mit fettlösenden Mitteln, wie Benzol und Amylen, und mit einbasischen Fettsäuren. Bei diesen Eiern genügt die Hervorrufung der Membranbildung, um die Entwickelung anzuregen, eine Nachbehandlung mit hypertonischem Seewasser ist hierbei nicht nötig[16]). Das hängt vielleicht damit zusammen, daß alle Seesterneier eine gewisse Tendenz haben, sich ohne Befruchtung spontan beim Liegen im Seewasser zu entwickeln. Vielleicht bilden die Hydroxylionen des Seewassers oder eine im Seesternei selbst gebildete Säure (z. B. CO_2) das entwickelungserregende Agens in diesem Falle. Bei Asterina kann man auch bemerken, dass bei längerem Liegen im Seewasser gelegentlich einige Eier ohne Befruchtung „spontan" eine Befruchtungsmembranbilden.

Bei Thalassema Mellita hat Lefevre die unbefruchteten Eier zur Reifung, normalen Furchung und normalen Entwickelung bloß durch kurze Behandlung derselben mit angesäuertem Seewasser

erregen können*). Alle beliebigen Säuren, HCl, Essigsäure, CO_2 schienen gleich günstig zu wirken. Eine Nachbehandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser besserte das Resultat nie. Auch diese Eier bilden bei der Behandlung mit Säure eine Befruchtungsmembran[17]).

V.

Wir kehren jetzt zu den Vorgängen der Entwickelungserregung beim Seeigelei zurück.

1. Wenn wir in irgend einer Weise, sei es durch Behandlung mit Benzol oder mit einer Fettsäure oder mit Alkali, die Membranbildung im unbefruchteten Ei von Strongylocentrotus hervorrufen, so werden damit zunächst dieselben Prozesse hervorgerufen, welche auch nach Eintritt des Spermatozoons im Ei eintreten: d. h. es tritt nach einigen Stunden die Bildung einer normalen Kernspindel und einer normalen Kernteilung ein. Ist die Temperatur sehr niedrig (2—5 ° C), so kommt es auch zu einer regelmäßigen Furchung, die gelegentlich bis zur Bildung einer Blastula führt. Das beweist, daß die Chromatinsynthese in den Gang gesetzt ist. Bei Zimmertemperatur aber geht die Entwickelung meist nicht weiter als bis zur Bildung der ersten Spindel oder der ersten oder zweiten Zellteilung; dann fängt das Ei an zu zerfallen und stirbt (bei Zimmertemperatur) in weniger als 24 Stunden. Bringen wir das Ei aber nach der Membranbildung 30—50 Minuten (bei 15 ° C) in hypertonisches Seewasser, so bleiben, bei richtiger Wahl der Expositionsdauer, alle Eier am Leben und entwickeln sich und bei einem in verschiedenen Versuchen verschieden hohen Prozentsatz der Eier erfolgt die Furchung und Entwickelung in völlig normaler Weise. Es ist also offenbar, daß die Hervorrufung des Membranbildungsprozesses beim Seeigelei die Nukleinsynthese und sonstige Entwickelung in den Gang setzt, daß aber die chemischen Vorgänge nicht ganz richtig verlaufen. Durch

*) Die Eier werden beispielsweise fünf Minuten lang in eine Mischung von 85 ccm Seewasser + 15 ccm N/10 Essigsäure gebracht.

die Nachbehandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser wird die Entwickelung in die richtigen Bahnen gelenkt. Diese Auffassung von der Bedeutung des Membranbildungsprozesses wird unterstützt durch Lefevres Beobachtung an Thalessema, und an meinen Beobachtungen an Asterina. In beiden Fällen genügt die Hervorrufung des Membranbildungsprozesses, um das Ei zur Entwickelung in eine normale Larve bei Zimmertemperatur zu veranlassen. Hier verläuft also die Nukleinsynthese von vornherein in den richtigen Bahnen und eine Nachbehandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser ist nicht nötig. Unser Verständnis der Entwickelungserregung hängt also von der Beantwortung folgender drei Fragen ab. Erstens was ist der physikalisch-chemische Charakter der Membranbildung, der diesen Vorgang befähigt, die Entwickelung des unbefruchteten Eies in den Gang zu setzen. Zweitens warum erfolgt diese Entwickelung beim Seeigelei in falschen Bahnen? Drittens in welcher Weise führt die Behandlung mit hypertonischem Seewasser die Entwickelung wieder in die richtigen Bahnen? Wir wollen diese Fragen der Reihe nach aufnehmen.

2. Was den physikalisch-chemischen Charakter des Membranbildungsprozesses bei Strongylocentrotus betrifft, so haben wir gesehen, daß derselbe durch verschiedene Mittel beim Seeigelei hervorgerufen werden kann, nämlich erstens durch fettlösende Stoffe, wie Benzol, Toluol, Amylen, zweitens durch eine länger dauernde Alkalibehandlung und drittens durch eine bestimmte Gruppe von Säuren, nämlich einbasische Fettsäuren und überhaupt alle Säuren, die eine einzige Karboxylgruppe enthalten. HCl, HNO_3, H_2SO_4, NaH_2PO_4, zweibasische organische Säuren, wie Bernsteinsäure, Oxalsäure u. a. erwiesen sich als ungeeignet. Es handelt sich also nicht um eine Wirkung der Wasserstoffionen; dieselben hemmen nur den Prozeß, was daraus hervorgeht, daß die Membranbildung nicht stattfindet, während die Eier im angesäuerten Seewasser sind, sondern erst nach der Übertragung derselben in normales Seewasser. Auch sind die unwirksamen Säuren wie HCl etc. nicht dadurch unwirksam, daß sie schädigende Nebenwirkungen auf das Ei üben. Denn eine zur Hervorrufung der Membranbildung geeignete Mischung von See-

wasser und Buttersäure bleibt ebenso wirksam, wenn man derselben einen der Buttersäure äquivalenten Betrag von Salzsäure zusetzt. Es handelt sich nur darum, daß gewisse Säuren wirksam, andere unwirksam sind. Fragen wir nun, was alle drei Gruppen von membranbildenden Agentien gemeinsam haben, so ist es ihre Beziehung zu den Fetten resp. Lipoiden. Benzol, Toluol, Amylen sind ausgezeichnete fettlösende Stoffe. Die fettlösende und fett- und lipoidspaltende Wirkung der Alkalien ist bekannt. Die einbasischen Fettsäuren sind alle fettlösende Stoffe und die fettlösende Wirksamkeit nimmt mit der Konzentration derselben zu. Die Technik bedient sich der reinen Essigsäure und Buttersäure für diese Zwecke[18]).

Nun haben wir gesehen, daß die Spaltung gewisser Lipoide, z. B. Lezithin, wahrscheinlich einer der Prozesse ist, der die Voraussetzung der Nukleinsynthese bildet. Der Spaltung der Fette muß eine Verflüssigung derselben voraufgehen. Bei den verschiedenen Tierformen ist bekanntlich der Flüssigkeitsgrad der Körperfette verschieden, je nach dem Anteil an den verschiedenen höheren Fettsäuren. Es ist recht gut möglich, daß bei den Seeigeln nur solche Säuren für die Hervorrufung des Membranbildungsprozesses wirksam sind, die zugleich auch Fette zu lösen imstande sind, also die einbasischen Fettsäuren oder vielleicht allgemeine Säuren mit einer Karboxylgruppe. Außerdem mögen diese Säuren dann auch für die Spaltung in Betracht kommen, aber diese Wirkung kann von jeder beliebigen Säure übergenommen werden. Danach dürfte also die Verflüssigung eines Fettes als der wesentliche Grundzug der Membranbildung bezeichnet werden.

3. Diese Vermutung wird durch eine zweite Gruppe von Tatsachen unterstützt, welche zeigen, daß die Membranbildung ein Durchgangsstadium bei der Cytolyse des Eies, d. h. dessen Verwandlung in einen Schatten ist. Bei der Behandlung der Eier mit kräftigen fettlösenden Stoffen, wie Benzol und Amylen, ist das ohne weiteres sichtbar. Wenn man die Eier nicht sofort nach der Membranbildung aus dem benzolhaltigen Seewasser bringt, so werden alle Eier nach der Membranbildung in Schatten verwandelt. Die Behandlung der unbefruchteten Eier mit Alkali führt auch rasch zur

Membranbildung und Verwandlung der Eier in Schatten, wenn man nur dafür sorgt, dass alle Ca und Mg aus der Lösung entfernt wird.

Wie ich vor drei Jahren gezeigt habe, ist es der Ca- und Mg-Gehalt des Seewassers und die Bildung von seifenartigen Verbindungen durch diese Körper die Cytolyse in alkalischen Lösungen hindern[19]). Bei der Behandlung der Eier mit Fettsäuren werden sie nicht in Schatten verwandelt, allein das ist durch die hemmende Wirkung der Wasserstoffionen bedingt. In Gegenwart der Wasserstoffionen von genügender Konzentration vermögen weder die Fettsäuren noch Benzol im Ei die Membranbildung oder die Cytolyse auszulösen. Auch bei der Cytolyse des Eies durch hypotonische und hypertonische Lösungen ist die Membranbildung von seiten des Eies ein Durchgangsstadium.

Nun hat die Untersuchung des Mechanismus der Cytolyse bei roten Blutkörperchen es nach Koeppe wahrscheinlich gemacht, daß dieser Vorgang hier in einer Lipolyse besteht[20]). Koeppe nimmt an, daß die Oberflächenlamelle der Blutkörperchen aus einer Lipoidhülle besteht, die bei der Cytolyse aufgelöst, resp. saponifiziert oder mechanisch zerstört wird. Ich glaube, daß das Gleiche auch für das Ei der Fall ist, nur mit dem Unterschied, daß es vielleicht nicht die oberflächlichste Lamelle beim Ei ist, die gelöst oder saponifiziert wird, sondern eine unter dieser Lamelle gelegene Schicht.

Diese Verflüssigung erlaubt das Auspressen von Flüssigkeit aus dem Cytoplasma vermittelst eines Sekretionsprozesses und das Abheben der Oberflächenlamelle. Kommt die Fettlösung resp. Saponifikation frühzeitig zum Stillstand, so bleibt es bei der Membranbildung und eine neue Lipoidschicht wird an der Oberfläche des Cytoplasmas gebildet; anderenfalls kommt es zur Cytolyse des Eies. Vielleicht ist für die feste Lipoidschicht eine Calciumlipoidverbindung (Calciumlezithinverbindung?) erforderlich.

Mit dieser Auffassung des Mechanismus des Membranbildungsprozesses stehen nun die Beobachtungen über die Detailerscheinungen bei diesem Prozeß im Einklang, worauf ich aber hier nicht eingehen kann.

Wir sahen nun in der Einleitung, daß für die Synthese von

Nukleinsäure in aller Wahrscheinlichkeit die Spaltung einer phosphorhaltigen organischen Verbindung, des Lezithins, nötig ist. Wir verstehen also, warum derselbe Vorgang, der zur Bildung der Befruchtungsmembran führt, auch zur Ingangsetzung der Nukleinsynthese führen kann[21]).

4. Da ich vor sieben Jahren die Vermutung ausgesprochen habe, daß der Membranbildungsprozeß auf einer Gerinnung beruhe, so möchte ich hier kurz hervorheben, warum ich diesen Gedanken aufgegeben habe. Die besten Agentien, um eine Membranbildung hervorzurufen, sind Stoffe wie Toluol, Benzol, deren fettlösende Wirkung sehr groß, deren gerinnende Wirkung sehr gering oder Null ist; Toluol wird ja bekanntlich zur Konservierung von Eiweißlösung bei lange dauernden Versuchen angewendet, ohne daß eine Spur Gerinnung eintritt. Phenol hat dagegen eine sehr hohe gerinnungserregende, aber eine schwächere, fettlösende Wirkung als Toluol oder Benzol. Wenn nun der Vorgang der Membranbildung in einer durch diese Stoffe bedingten Gerinnung bestünde, so sollte Phenol viel wirksamer sein für die Hervorrufung der Membranbildung als Benzol; wenn diese Stoffe aber durch ihre fettlösenden Eigenschaften die Membranbildung hervorrufen, so muß das umgekehrte der Fall sein. Benzol ist fast unlöslich in Seewasser. Zum Zwecke der Hervorrufung der Membranbildung wurden ungefähr 2 Tropfen Benzol in 50 ccm Seewasser gebracht und die Mischung geschüttelt. Um die Löslichkeit des Benzols zu vermehren, wurde das Seewasser vorher auf 30° C erwärmt. Das Schütteln verursachte eine Emulsion, aber nur eine Spur des Benzols ging in Lösung. Nichtsdestoweniger genügte diese Spur, um sofort die Membranbildung hervorzurufen. Phenol ist dagegen sehr leicht löslich in Seewasser. Es war aber nötig, 6 ccm $\frac{m}{2}$-Phenol (Kahlbaum) zu 50 ccm Seewasser zuzufügen, um die Membranbildung hervorzurufen. Auch der Umstand, daß die Membranbildung nicht eintritt, während die Eier in der säurehaltigen Lösung sind, sondern erst nachdem sie in normales Seewasser zurückgebracht sind, zeigt, daß die Membranbildung durch Fettsäure nicht auf einer Säuregerinnung beruht,

sondern daß ihr ein durchaus anderer Vorgang zugrunde liegt, nämlich ein Sekretionsprozeß.

Wir können auch hier die Frage anschließen, wie das Spermatozoon den Membranbildungsprozeß hervorruft.

Sobald das Spermatozoon des Seeigels oder des Seesternes in das Ei tritt, bewirkt es eine Membranbildung; es ist aber nicht bekannt, wie die Membranbildung ausgelöst wird. Herr Kupelwieser gibt an, daß er in einigen Fällen eine Membranbildung durch den wässerigen Extrakt von Seeigelsamen beobachtet habe, es ist mir aber in zahlreichen Versuchen bisher nicht gelungen, diesen Versuch zu wiederholen. Die Daten über die Zusammensetzung des Spermatozoons erlauben kaum einen Schluß auf die wirksame membranbildende Substanz des Spermatozoons zu ziehen.

Wenn ich eine vorläufige Vermutung aussprechen darf, so würde es die sein, daß möglicherweise das Spermatozoon unter anderem an seiner Oberfläche eine fettlösende Substanz hat, z. B. etwas freie Oleinsäure. Bei dem relativ hohen Gehalt des Schwanzes an Fetten ist das durchaus möglich. Daß Oleinsäure in der Tat die Membranbildung hervorruft, läßt sich schön nachweisen, wenn man Seeigeleier in eine NaCl-Lösung mit etwas Natriumoleinat bringt, dem man eine Spur Salzsäure zuseszt. Es bildet sich dann etwas freie Oleinsäure. Bringt man die Eier dann nach genügend langer Exposition in normales Seewasser, so bilden die Eier eine typische Befruchtungsmembran, und wenn man sie mit hypertonischem Seewasser behandelt, so entwickeln sie sich.

5. Die zweite Frage, die wir aufwarfen, war folgende: Warum geht der Vorgang der Nukleinsynthese nach der künstlichen Membranbildung bei Zimmertemperatur nicht lange normal weiter und warum kommt es statt zu einer normalen Entwickelung zu einem raschen Zerfall eines solchen Eies? Wir sind imstande, hierauf eine bestimmte Antwort zu geben. Wie wir am Eingang unseres Vortrags erwähnten, sind Oxydationsprozesse die unerläßliche Vorbedingung der Nukleinsynthese. Auch die Nukleinsynthese nach der Hervorrufung des Membranbildungsprozesses und die Kern- und

Zellteilungsprozesse hängen von Oxydationen ab und treten nicht ein bei der Abwesenheit von Sauerstoff oder bei Unterdrückung der Oxydationen durch Cyankalium. Es läßt sich nun zeigen, daß auch der Zerfall solcher Eier nicht eintritt, wenn die Eier nach der Membranbildung in eine reine Wasserstoffatmosphäre gebracht werden, oder wenn man die Oxydationen durch Zusatz von etwas Cyankalium hemmt. Solche Eier bleiben intakt und können nach vielen Stunden durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser zur Entwickelung gebracht werden [22]), während die dem lufthaltigen Seewasser ausgesetzten Eier desselben Versuches bereits zerfallen sind oder im Zerfall begriffen sind. Wir müssen daraus schließen, daß nach der Auslösung des Membranbildungsprozesses die Nukleinsynthese zwar beginnt, aber fehlerhaft verläuft, und zwar infolge fehlerhafter Oxydationsprozesse; und diese fehlerhaften Oxydationsprozesse führen um so schneller zum Zerfall des Eies, je höher die Temperatur ist.

Diese Auffassung wird gestützt durch die Versuche zur Beantwortung der dritten Frage, nämlich wie es kommt, dass Behandlung der membranbesitzenden Eier mit hypertonischem Seewasser die normale Entwickelung ermöglicht. Es stellte sich nämlich in allen Versuchen heraus, daß die hypertonische Lösung diese Wirkung nur dann hat, wenn dieselbe freien Sauerstoff enthält [23]). Ersetzt man in dieser Lösung die Luft durch reinen Wasserstoff, oder setzt man derselben einen minimalen Betrag von Cyankalium zu, so bleibt diese Wirkung aus. Bringt man die membranbesitzenden Eier nach 30—50 Minuten aus dem sauerstofffreien hypertonischen Seewasser in normales Seewasser, so zerfallen sie alsbald alle in derselben Weise als ob sie nicht in der hypertonischen Lösung gewesen wären; während sie, wenn man sie hinterher noch 30—50 Minuten in eine sauerstoffhaltige hypertonische Lösung bringt, sich entwickeln. Noch deutlicher ist die Rolle des freien Sauerstoffes bei Versuchen mit der rein osmotischen Entwickelungserregung von Eiern, die keine Membran besitzen. Bringen wir die unbefruchteten Eier von Strongylocentrotus zwei Stunden lang bei einer Temperatur von 15° C in hyperalkalisches hypertonisches Seewasser, z. B. 50 ccm

Seewasser + 10 ccm 2 1/2 n NaCl + 1,5 ccm n/10 NaHO, so entwickeln sich nach der Übertragung in normales Seewasser viele Eier, während andere geschädigt werden und rasch zugrunde gehen. Diese Wirkung wird aber nur erzielt, wenn die hypertonische Lösung sauerstoffhaltig ist. Befreit man sie vollständig vom Sauerstoff, oder hemmt man die Oxydationsvorgänge im Ei, indem man ihr eine Spur Cyankalium zusetzt, so sind die Eier intakt, wenn sie aus der Lösung kommen. Sie furchen sich nicht, entwickeln sich nicht zu Larven und zerfallen nicht. Fügt man einige Stunden später Samen zu solchen Eiern, oder behandelt man sie mit lufthaltigem hypertonischem und hyperalkalischem Seewasser, so entwickeln sie sich. Wie man auch die Versuche variieren mag, stets läßt sich zeigen, daß die Wirkung des hypertonischen Seewassers nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff möglich ist. Das scheint darauf hinzudeuten, daß die Wirkung der hypertonischen Lösung bei der künstlichen Parthenogenese in einer Modifikation der Oxydationsvorgänge im Ei besteht, und zwar in dem Sinne, daß die letzteren in die richtigen Bahnen gelenkt werden. Darum also ermöglicht die Nachbehandlung der membranbesitzenden Eier mit hypertonischem Seewasser denselben die normale Furchung und Entwickelung[24]).

VI.

Fassen wir alle Versuche über künstliche Parthogenese zusammen, so besteht das Wesen der Entwickelungsreize erstens in Methoden, durch die Fette oder Lipoide verflüssigt und saponifiziert oder hydrolysiert werden, und zweitens in Methoden, durch welche die Oxydationen (eventuell der Fette) angeregt oder in die richtigen Bahnen gelenkt werden. Bei manchen Formen tritt der letztere Vorgang von selbst ein, wenn nur der erstere in den Gang gesetzt wird, z. B. Asterina und Thalassema. Bei den Eiern vieler Formen verläuft die Verflüssigung und Saponifikation der Lipoide unter der Erscheinung der Membranbildung. Das Bild, das wir hier von dem Befruchtungsvorgang entworfen haben, ist nicht willkürlich gewählt. Es ist in voller Harmonie mit den Tatsachen, die Hoyer und

andere über die Keimung ölhaltiger Pflanzensamen gefunden haben. Die Keimung der Samen wird im allgemeinen nicht als Entwickelungserregung bezeichnet, in Wirklichkeit handelt es sich aber um denselben Vorgang. Ruhende Zellen treten in den Zustand lebhafter Teilungsvorgänge und diese Teilungsvorgänge schließen ebenfalls als wesentliche Voraussetzung die Synthese von Nukleinsubstanzen für die Bildung der neuen Kerne ein. Nun haben die Versuche über das Keimen ölhaltiger Samen (der Rizinusbohne) ergeben, daß zunächst beim Einlegen der Samen in Wasser, neben dem Quellen derselben, ein hydrolytischer Prozess in den Gang gesetzt wird, der zur Bildung einer oder mehrerer Säuren führt, Kohlensäure und Milchsäure. Sobald die Konzentration dieser Säuren eine gewisse Höhe erreicht, was nach einigen Tagen der Fall ist, wird durch diese Säuren ein lipolytisches Enzym aktiviert und dieses Enzym spaltet rasch die Fette der Samen [25]). Von da an dürfte der Verlauf der Nukleinsynthese ähnlich verlaufen, wie im tierischen Ei, da ja auch, wie schon Moritz Traube gezeigt hat, die Keimung der Pflanzensamen nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff erfolgt. Wir könnten andererseits auch wohl die Frage aufwerfen, ob nicht auch bei der Entwickelungserregung des tierischen Eies in manchen Fällen der Fettspaltung eine Aktivierung einer Lipase resp. eine hydrolytische Abspaltung derselben aus einem Zymogen voraufgeht.

Wir können es so auch verstehen, warum gewisse Eier sich ohne Befruchtung entwickeln können, d. h. natürliche Parthenogenese zeigen. In diesen natürlich parthenogenetischen Eiern kann die Nukleinsynthese in den Gang gesetzt werden, ohne das Hinzukommen eines äußeren Agens. In Analogie mit den Erfahrungen über künstliche Parthenogenese und an Samen dürfen wir vielleicht schließen, daß eine Säure (CO_2 oder eine Fettsäure, z. B. Milchsäure), welche in denselben gebildet wird, nachdem sie das Ovarium verlassen haben, ausreicht, die für die Entwickelung nötigen Hydrolysen in den Gang zu setzen; entweder direkt oder indirekt durch Aktivation eines oder mehrerer Enzyme. Solche Eier müssen auch die Vorbedingungen besitzen, welche für den normalen Ablauf der Oxydationsvorgänge nötig sind.

Unter den Eiern, welche der Befruchtung für ihre Entwickelung bedürfen, müssen wir mindestens zwischen zwei Gruppen unterscheiden, nämlich erstens solchen, für welche die Hydrolysen (Lipolysen?) genügen, um die Nukleinsynthesen in den Gang zu setzen, z. B. die Eier vom Seestern, Thalessema, Polynoë u. a.; zweitens solchen, bei denen außerdem auch noch die Oxydationsvorgänge durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser oder mit anderen Mitteln in die richtigen Bahnen gelenkt werden müssen, nämlich beispielsweise die Eier des kalifornischen Seeigels Strongylocentrotus purpuratus und einer Gruppe von Mollusken, Lottia gigantea und Acmaea.

Wenn wir nun nach allen diesen Erörterungen wieder zu dem Punkt zurückkehren, von dem wir in der Einleitung ausgingen, so gewinnen wir den Eindruck, als sei die Nukleinsynthese der Faden, an dem wir unseren Weg durch das Labyrinth der spezifischen Lebenserscheinungen finden können, nämlich der Vorgänge des Wachstums durch Zellvermehrung. Das möge durch ein Beispiel veranschaulicht werden. Wir sind nämlich imstande nachzuweisen, daß der Kern oder einer seiner Bestandteile als ein Katalysator bei der Nukleinsynthese im befruchteten Ei wirkt. Das dürfen wir aus der Tatsache schließen, daß die Geschwindigkeit der Nukleinsynthese im befruchteten Ei genau im selben Verhältnis wie die Masse und Zahl der bereits im Ei vorhandenen Kerne zunimmt. Wenn wir die Masse des ursprünglichen Befruchtungskernes als m bezeichnen, so wächst zwischen der ersten und zweiten Teilung die Nukleinmasse auf 2 m, während der nächsten Periode wächst sie auf 4 m, dann auf 8 m usw. Die Dauer der einzelnen Teilungsperioden unterliegt nur geringen Schwankungen und diese Schwankungen haben keine Beziehung zur Masse des während der betreffenden Periode gebildeten Kernmaterials. Dieses Verhalten der Geschwindigkeit einer Reaktion ist charakteristisch für diejenigen chemischen Prozesse, bei denen eines der Reaktionsprodukte ein Katalysator oder Ferment für die Reaktion ist. Derartige Reaktionen werden als autokatalytisch bezeichnet. Wir müssen demnach schließen, daß der Kern oder einer seiner Bestandteile als Katalysator für die Nukleinsynthese oder eine Stufe dieses Prozesses wirkt [26]).

Es ist möglich, daß diese katalytische Wirkung sich nur auf die Oxydationen bezieht. Die Oxydationsvorgänge sind ja die unerläßliche Voraussetzung für die Nukleinsynthese; und es ließe sich so verstehen, daß die Geschwindigkeit der Nukleinsynthese bei der Furchung der Zahl der bereits gebildeten Kerne proportional ist. Vor mehreren Jahren wies ich darauf hin, daß der Kern vielleicht das Hauptoxydationsorgan der Zelle ist.

Diese Wirkung des Zellkernes auf die Nukleinsynthese und die Bedeutung der Nukleinsynthese für das Wachstum und die Fortpflanzung führen eine der rätselhaftesten Eigenschaften der Zellen, nämlich die automatische Fortpflanzung, auf eine wohlbekannte Tatsache der Fermentchemie, nämlich die Autokatalyse zurück.

Anmerkungen und Literaturnachweise.

1. Für die Begründung dieser Ansicht verweise ich den Leser auf die Kapitel über Zellteilung und Befruchtung in meinen „Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen", Leipzig **1906**.
2. Burian, R., Chemie der Spermatozoen: Ergebnisse der Physiologie, 5. Jahrg. **1906**.
3. Siehe die vorhin zitierte Arbeit von Burian.
4. Untersuchungen über die physiologischen Wirkungen des Sauerstoffmangels. Pflügers Archiv, Bd. 62, S. 249, **1895**.
5. Loeb, Versuche über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorgangs. Biochemische Zeitschrift Bd. I. S. 183, **1906**.
6. Siehe die vorhin zitierte Arbeit.
7. Loeb, Untersuchungen über künstliche Parthenogenese, Leipzig **1906**, S. 382—483. Godlewski, Archiv für Entwickelungsmechanik Bd. 20, S. 579, **1906**. Kupelwieser, Biologisches Zentralblatt Bd. 26, S. 744, **1906**.
8. Meine früheren Arbeiten über künstliche Parthenogenese sind in den vorhin zitierten „Untersuchungen" abgedruckt.
9. Eine andere Methode, die Eier nach der Membranbildung zur Entwickelung zu bringen, besteht darin, daß man dieselben mehrere Stunden lang in eine Atmosphäre von reinem Wasser- oder in cyankaliumhaltiges Seewasser bringt. Die Eier entwickeln sich zu Pluteen, aber die Zahl der sich entwickelnden

Eier ist viel geringer, als wenn man die Eier nach der Membranbildung 40—50 Minuten mit hypertonischem Seewasser behandelt. Diese Versuche, bei denen Seeigeleier ohne Behandlung mit hypertonischem Seewasser zur Entwickeluug gebracht wurden, beschrieb ich in „Untersuchungen“ S. 487 u. ff. und eingehender in der Abhandlung „über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges“, Biochemische Zeitschrift Bd. I. **1906.**

10. Bringt man die Eier nach der Hervorrufung der künstlichen Membranbildung in eine niedere Temperatur, etwa 2^0—4^0 C, so entwickeln sie sich manchmal bis zur Blastula, ohne daß eine Behandlung mit hypertonischem Seewasser hierzu nötig wäre. Biochem. Zeitschr. Bd. I.
11. Über eine verbesserte Methode der künstlichen Parthenogenese, „Untersuchungen“ S. 315—349.
12. Ich war ursprünglich an die Versuche über künstliche Parthenogenese mit dem Gedanken getreten, daß die Hydroxylionen oder Wasserstoffionen das befruchtende Agens seien. Infolgedessen arbeitete ich im Jahre 1899 hauptsächlich daran, die unbefruchteten Seeigeleier durch Alkalien oder Säuren zur Entwickelung anzuregen. Es gelang mir damals auf diesem Wege nur, die ersten Furchungsvorgänge hervorzurufen. Die Resultate dieser Versuche erwähnte ich kurz in meiner ersten ausführlichen Mitteilung, die im April 1900 erschien („Untersuchungen“ S. 102—104 u. S. 146). Ich gab aber den Gedanken nicht auf und konnte bald über positive Resultate für die Wasserstoffionen berichten, nämlich bei Chaetopterus und Seesternen („Untersuchungen“ S. 167 u. 278). Vor nahezu zwei Jahren wurde ich auf die Bedeutung der Hxdroxylionen in der hypertonischen Lösung aufmerksam und berichtete darüber vorläufig in einer Abhandlung „Über die Hemmung der toxischen Wirkung hypertonischer Lösungen auf das Seeigelei durch Sauerstoffmangel und Cyankalium“, Pflügers Archiv Bd. 113 anf S. 505 mit den folgenden Worten: „Ich habe auch den Eindruck gewonnen, daß hypertonisches See-

wasser rascher die künstliche Parthenogenese unbefruchteter Seeigeleier hervorruft, wenn es schwach alkalisch, als wenn es neutral ist (mit Phenolphthalein als Indikator), beabsichtige aber hierüber noch weitere Versuche anzustellen.“ Im Jahre 1906 folgte dann die ausführliche Untersuchung über die für die Entwickelung der Seeigeleier nötige und optimale Konzentration der Hydroxylionen, wobei von der Friedenthal-Salmschen Methode der Bestimmung der Konzentration der Hydroxylionen Gebrauch gemacht wurde. Die Resultate dieser Versuche wurden unter dem Titel „Über die Ursachen der Giftigkeit einer reinen Chlornatriumlösung und ihrer Entgiftung durch K und Ca“ in der Biochemischen Zeitschrift Bd. II. S. 81, **1906** veröffentlicht. Diese Arbeiten sind — wie viele andere meiner Abhandlungen — Delage anscheinend unbekannt geblieben.

13. Die erste vorläufige Mitteilung über diese Resultate wurde in der New York Society for Experimental Biology and Medicine im März **1907** publiziert. Die ausführliche Mitteilung erfolgte in Pflügers Archiv Bd. 118, S. 181, **1907**. („Zur Analyse der osmotischen Entwickelungserregung unbefruchteter Seeigeleier“.) Weitere auf den Gegenstand bezügliche Versuche findet der Leser in zwei weiteren Abhandlungen in Pflügers Archiv Bd. 118, S. 30 u. S. 572.
14. Die hier erwähnten Versuche an Polynoe, Lottia und Sipunculus sind in einer Arbeit „Über die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese“ in Pflügers Archiv Bd. 118, S. 572, **1907** mitgeteilt.
15. Im Jahre 1901 zeigten Neilson und ich, daß beliebige Säuren die unbefruchteten Eier von Asterias Forbesii zur Entwickelung anregen. Die Kohlensäure hatten wir nicht versucht. Diese Lücke wurde im folgenden Jahre von Delage ausgefüllt. Anstatt nun zu erkennen, daß es sich hier, wie in unseren Versuchen, um eine Säurewirkung handelte, behauptete Delage, daß es sich um eine spezifische Kohlensäurewirkung handele. Er stützte sich darauf, daß er mit HCl keine so große Zahl

von Larven erhalten habe, wie mit CO_2. Ich bin Delage in diesen Dingen nicht entgegengetreten, weil ich es nicht für nötig hielt, darauf hinzuweisen, daß wenn Säuren allgemein eine bestimmte Wirkung haben und diese Wirkung sich auch bei der Kohlensäure findet, das nichts befremdendes hat, da Kohlensäure doch ebenfalls eine Säure ist. Ich befand mich aber im Irrtum; denn so gut wie alle späteren Arbeiter auf diesem Gebiete — Lefevre ist wohl die einzige Ausnahme — entschieden sich für die Delagesche Annahme, daß Kohlensäure keine Säurewirkung besitze und Driesch ging in den „Ergebnissen" so weit, daß er nur die entwickelungserregende Wirkung der Kohlensäure erwähnte, aber die Tatsache, daß beliebige andere Säuren ebenso wirken, ignorierte. Es macht natürlich für die weitere Forschung einen gewaltigen Unterschied, ob es sich hier um eine allgemeine Wirkung der Säuren, d. h. der Wasserstoffionen oder um eine mysteriöse, spezifische Wirkung der Kohlensäure handelt.

16. „Untersuchungen" S. 349.
17. Ich möchte die Arbeit Lefevres besonders der Beachtung der auf diesem Gebiete arbeitenden Biologen empfehlen. Lefevre, Artificial Parthenogenésis in Thalessema mellita. Journal of Experimental Zoology, Vol. IV, p. 91, **1907**.
18. Die Diskussion der Stoffe, welche eine Membranbildung hervorrufen, findet der Leser in „Untersuchungen" S. 329. Was die mögliche fettlösende Wirkung der einbasischen Fettsäuren anbelangt, so stelle ich mir vor, daß sie in die Lipoidhülle oder sonstigen Lipoide der Eier eindringen. Es besteht also hier eine Mischung von Lipoiden und reiner Fettsäure, wodurch die ersteren flüssiger werden.
19. Ich habe in einer ausführlichen Abhandlung gezeigt, daß in einer alkalischen Chlornatriumlösung bei genügend hoher Konzentration der Hydroxylionen die Eier des Seeigels cytolysiert werden. Setzt man aber zu der alkalischen NaCl-Lösung eine kleine Menge von $CaCl_2$, so wird diese Cytolyse und Membranbildung gehemmt. Loeb, Biochemische Zeitschrift Bd. 2,

S. 81, **1906** und Über die anticytolytische Wirkung der Salze mit zweiwertigen Metallen, Biochemische Zeitschrift Bd. 5, S. 351, **1907**.

20. Koeppe, Über das Lackfarbenwerden der roten Blutkörperchen, Pflügers Archiv Bd. 99, S. 33, **1903**.
21. Mit dieser Auffassung über die Rolle der Fettsäuren, Alkalien und Kohlenwasserstoffe bei der Membranbildung und der Anregung zur Entwickelung steht eine Tatsache im Einklang, welche ich vor anderthalb Jahren in meiner oben zitierten Abhandlung über „den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges" mitteilte. Ich konnte nämlich zeigen, daß die Hervorrufung des Membranbildungsprozesses durch Buttersäure oder durch das Spermatozoon von der Gegenwart von freiem Sauerstoff völlig unabhängig ist, und auch in keiner Weise durch KCN gehemmt wird. Eier, die 24 Stunden lang in einer KCN-Lösung gelegen hatten, bildeten in einer solchen Lösung eine Membran. Biochemische Zeitschrift Bd. I, S. 191, **1906**.
22. Wie bereits erwähnt, können solche Eier, wenn sie nicht zu lange in der Wasserstoffatmosphäre oder im cyankaliumhaltigen Seewasser bleiben, sieh sogar zu Larven entwickeln, ohne daß es nötig wäre, dieselben in hypertonisches Seewasser zu bringen.
23. Untersuchungen, S. 491. Biochemische Zeitschrift, Bd. I, S. 194—199. Ferner: Weitere Versuche über die Notwendigkeit von freiem Sauerstoff für die entwickelungserregende Wirkung hypertonischer Lösungen. Pflügers Archiv Bd. 118, S. 30, **1907**.
24. Wie ich im Jahre 1905 zuerst zeigte, setzt sich die künstliche Parthenogenese beim Seeigelei aus zwei Eingriffen zusammen, von denen der eine in der Behandlung der Eier mit einer Fettsäure besteht, der zweite in einer Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser. Ich zeigte dann 1906, daß für den ersteren der beiden Vorgänge, nämlich die Säurewirkung, kein freier Sauerstoff nötig ist, während für den zweiten Vorgang (die Wirkung der hypertonischen Lösung) freier Sauerstoff

nötig ist. Das entspricht der Annahme, daß der erstere Vorgang in einer Verflüssigung und Spaltung von Lezithin besteht, der natürlich von Oxydationsvorgängen unabhängig ist.

25. Hoyer, Über fermentative Fettspaltung. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 50, S. 414, **1907**.

26. Auf diese autokatalytische Wirkung des Kerns bei der Nukleinsynthese habe ich in einer Arbeit „Weitere Beobachtungen über den Einfluß der Befruchtung und der Zahl der Zellkerne auf die Säurebildung im Ei“ aufmerksam gemacht. Biochem. Zeitschrift, Bd. II, S. 34, **1906**.

WELLCOME LIBRARY INSTITUTE